中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 50(3): 12～24 (2001)

利用DNA分子標識確認落花生種間雜交種 (4x × 2x) 基因組組成與外表型變異間之矛盾性[1]

黃惠娟[2]　林順福[3]　謝兆樞[4]

摘要：本研究利用RAPD及SSR分子標識來分析落花生不同倍數性種間雜種 (4*x* × 2*x*) 的多型性產生之頻率，並探討不同倍數性之種間親本對後代DNA多型性之貢獻是否有差異存在。試驗結果顯示，使用水稻或玉米的Intra-SSR引子可由PCR增幅落花生基因組約11個DNA片段，而Inter-SSR則可由PCR增幅約7個落花生DNA片段。Intra-SSR 及Inter-SSR單一引子產生親本多型性之比率，平均分別為45.4%及45.1%高於RAPD的41.3%。而Intra-SSR及Inter-SSR產生各個條帶之多型性比率分別為34.2%及36.0%，亦高於RAPD的33.6%。而不論是RAPD或SSR的分析，可發現F_1的DNA條帶形式與栽培種母本相近，且其多型性條帶平均有66.8%是來自母本，只有33.2%的條帶是來自野生種父本，此種結果與基因組來源及貢獻量相符，但是卻與種間雜交種之外表型變異傾向於野生種之結果不合。因此，本試驗由分子層次確認支持基因組大小與植株外表型變異之不一致性。建議本試驗結果，可提供作物基因組及基因表現研究與種間雜交利用於品種改良之參考。

關鍵詞：落花生、種間雜交種、分子標識。

前　言

栽培種落花生 (*Arachis hypogaea* L.) 在不同基因型間的植株型態及農藝性狀均有著明顯的變異存在，但在前人的RAPD、RFLP等分子標識分析，發現在各基因型間DNA層次的變異並不大，亦即在栽培種中其遺傳岐異度 (genetic diversity) 非常小，此現象在台灣的栽培種中情況更甚[(1)]，而在野生種中同樣經由分子標識的分析，發現有非常大的變異存在[(5, 8, 9)]。且早在1972年開始的前人研究中，陸續指出野生種落花生的抗蟲、抗病及抗旱等特性極具利用潛能[(4, 6, 11, 15)]，並已育成許多優良的種間雜交後代品系或品種[(13, 14)]。基於此黃等[(2)]自1994年開始進行落花生種間雜交之工作，期望能擴大台灣落花生栽培品種的遺傳變異性，並且將有利基因藉由種間雜交方式導入栽培種落花生。在已經完成的9個雜交組合中，已有台南11號 × *A. spegazzinii*一組合繁衍至F_6世代，目前的觀察認為這些雜交後代對於未來的落花生抗銹病、抗葉斑病及抗紅蜘蛛的育種極具潛力[(3)]。而為進一步瞭解在落花生種間雜交後代中，野生種遺傳質導入 (introgression) 栽培種中的情形，可利用具特定來自栽培種或野生種的多型性 (polymorphism) 分子標識來追蹤、探討，亦即利用物種特定性的標識 (species-specific marker) 來標記及

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第2075號。
2. 本所農藝系助理研究員。臺灣　臺中縣　霧峰鄉。
3. 前本所農藝系助理研究員，現任台灣大學農藝系助理教授。台北市。
4. 台灣大學農藝系教授。台北市。

追蹤染色體滲入的片段[5, 9, 10]。

目前常用在植物育種上及鑑定雜交後代的分子標識有RAPD (random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)、RFLP (restriction fragment length polymorphism)、SCAR (sequence characterized amplified region)、STS (sequence targeted site) 及SSR (simple sequence repeat, or microsatellite DNA) 等，各有其利用上及操作上之優缺點，而以PCR (Polymorphism chain reaction) 技術爲基礎所發展的分子標識，因其操作程序簡便及快速，是植物分子遺傳分析及育種應用上最適當的分析工具之一。本研究室先前之研究發現四倍體栽培種落花生與二倍體野生種落花生雜交後代之變異傾向於野生種外表型[3]，此種結果與兩種間雜交親本之基因組倍數性之貢獻並不符合，可能係栽培種染色體的流失，或四倍體栽培種在多倍體化過程並未增加遺傳變異性等原因所造成。利用細胞遺傳技術雖然可以追蹤種間雜交種之染色體來源，但無法辨識不同來源染色體內DNA序列之差異性，而新近發展之DNA分子標識則可彌補此項缺點，但是目前尚未有詳細利用分子標識探討不同倍數性野生種與栽培種種間雜種之研究，即探討在PCR鑑定時產生DNA條帶是否等比例來自父本及母本，抑或有不同的結果，此種研究對基因組結構及其功能或與外表型間關係之瞭解，將有很大幫助。本試驗即利用其中操作簡便的RAPD及多型性高之SSR，以分析台南11號 × *A. spegazzinii* 種間雜交組合之兩親本及其F_1之間的多型性，探討落花生種間雜種基因組結構及多型性DNA條帶之來源，並進一步驗證不同倍數性落花生其基因組大小對雜交種外表型之影響，並提供日後引進野生種優良特性之參考。

材料與方法

一、材料：母本爲四倍體栽培種落花生 (*A. hypogaea*) 台南11號 (TP11)，父本爲二倍體野生種落花生 *A. spegazzinii*，及其三倍體之種間雜交F_1植株，三者取樣數均在9株上。

二、方法：

(一) 種間雜交：於每日下午5時後去雄，清晨6~8時授粉。

(二) DNA萃取：葉片組織DNA的萃取依Doyle *et. al.* (1990)[7]之方式進行。

(三) RAPD分析：進行親本及種間雜交後代之RAPD。RAPD分析於總體積23μl的反應進行，內容物含60 ng基因組DNA、0.2 mM dNTPs、1.5U Taq polymerase、0.3 μ*M*逢機引子 (10-mers,)、10 X PCR緩衝液，反應條件爲94℃ (變性, denature) 5分鐘後，進行45循環的94℃ 1分鐘、43℃ (黏接, annealing) 2分鐘、72℃ (延伸, extension) 3分鐘，最後72℃ 10分鐘。逢機引子購自British Columbia大學100支及Operon公司120支，總共220支，分別以UBC1-100及OPA1-20, OPB1-20, OPC1-20, OPD1-20, OPT1-20, OPAY1-20爲代號。

(四) SSR分析（simple sequence repeat，簡單重複序列，或稱microsatellite DNA）：於總體積23μl的反應液進行，內容物含量與RAPD相同，依其PCR放大機制之不同，可分爲Intra-SSR及Inter-SSR兩種。Intra-SSR引子以兩支爲一組，引子長度在15~30核苷酸對 (15-30 mers) 之間，序列是依據水稻及玉米之簡單重複DNA序列所設計，共有67組，其PCR產物爲重複序列片段。Inter-SSR所用之引子爲來自British Columbia大學所生產的100支簡單重複序列的SSR之商業產品，以UBC801-900爲代號。反應條件爲94℃ (變性, denature) 5分鐘後，進行35循環的94℃ 30秒、47℃ (黏接, annealing) 30秒、68℃ (延伸, extension) 20秒，其PCR產物則爲相鄰兩重複序列間之DNA片段。

(五) 電泳分析：上述RAPD分析之PCR產物以1％洋菜凝膠 (SeaKen LE agarose, FMC)，於10 X TAE緩衝液下，75V電壓下進行電泳；Intra-SSR分析之PCR產物以3％MetaPhore凝膠 (FMC)，於10X TAE緩衝液下，95V電壓下進行電泳；而Inter-SSR之PCR產物以2％洋菜凝膠 (SeaKen LE

agarose, FMC)，於10X TAE緩衝液下，95V電壓下進行電泳；三者電泳後以溴化乙錠 (EtBr) 染色，在UV燈下照相紀錄結果。

三、有效引子之測定：PCR反應後之產物經電泳分析，在父本或母本呈現具差異性的DNA條帶，亦即具有DNA片段多型性之引子，稱爲有效引子；若父、母本DNA條帶無差異性則不予計算，參考自He, G. and G. S. Prakash (1997) [12]。測定項目包括：

(一) DNA條帶數 (number of bands)：在父、母本呈現的總DNA條帶數。

(二) 多型性DNA條帶 (polymorphic bands)：計算在父、母本呈現具差異性的DNA條帶。

(三) 多型性比率 (polymorphic rate, %)：多型性DNA條帶÷總DNA條帶數。

(四) F_1的多型性條帶來源：判定在F_1植株的多型性條帶是來自父本或母本。

結 果

利用RAPD分析來偵測落花生種間雜交親本及F_1後代的DNA片段多型性結果列於表1-2及圖1，在UBC系列100支引子，有24支引子可區別父母本DNA的條帶形式，每一引子之平均條帶數爲10.7，多型性條帶平均爲3.7條，多型性比率爲34.6%，而F_1植株多型性條帶來源的測定，來自栽培種

表1. 在落花生親本及種間雜交F_1具有多型性之RAPD引子（UBC系列）

Table 1. RAPD primers (UBC set) detecting polymorphic DNAs of parents from the interspecific hybrid (F_1) and parents

Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F_1 polymorphic origin	
				Female	Male
UBC5	8	4	50.0	2	1
UBC9	9	3	33.3	2	1
UBC10	11	4	36.4	1	2
UBC11	14	3	21.4	2	0
UBC14	9	4	44.4	1	2
UBC17	9	4	44.4	3	1
UBC19	12	6	50.0	2	2
UBC21	13	2	15.4	1	1
UBC23	10	4	40.0	1	2
UBC28	14	4	23.6	1	2
UBC29	13	3	23.1	1	2
UBC37	14	7	50.0	5	2
UBC41	7	2	28.6	0	2
UBC48	11	4	36.4	3	1
UBC51	14	6	42.9	3	2
UBC53	10	2	20.0	1	1
UBC54	11	7	63.6	3	2
UBC56	9	1	11.1	0	1
UBC59	8	2	25.0	1	1
UBC61	11	5	45.5	3	0
UBC62	11	4	36.4	3	1
UBC72	10	2	20.0	0	2
UBC73	9	2	22.2	1	0
UBC97	9	4	44.4	2	2
Total	256	89	---	42 (56%)	33 (44%)
Average	10.7	3.7	34.6	1.8	1.4

表2. 在落花生親本及種間雜交F_1具有多型性之RAPD引子（Operon系列）

Table 2. RAPD primers (Operon set) detecting polymorphic DNAs of parents from the interspecific hybrid (F_1) and parents

Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F_1 polymorphic origin		Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F_1 polymorphic origin	
				Female	Male					Female	Male
OPA1	12	7	58.3	3	1	OPC18	6	4	66.7	3	0
OPA2	15	9	60.0	4	0	OPC19	8	3	37.5	3	0
OPA4	7	3	42.9	2	1	OPC20	6	3	50.0	1	1
OPA5	8	4	50.0	3	0	OPD3	12	5	41.7	1	0
OPA9	7	4	57.1	4	0	OPD5	8	4	50.0	1	0
OPA10	9	3	33.3	3	0	OPD6	8	4	50.0	2	2
OPA11	11	7	63.6	3	2	OPD7	6	1	16.7	0	1
OPA12	9	5	55.6	2	2	OPD8	10	3	30.0	2	1
OPA14	9	4	44.4	1	2	OPD10	7	5	71.4	2	2
OPA15	9	4	44.4	2	2	OPD12	7	2	28.6	1	0
OPA17	7	4	57.1	3	0	OPD13	12	4	33.3	1	1
OPA18	9	5	55.6	3	0	OPD14	8	6	75.0	4	1
OPA19	9	4	44.4	3	1	OPD16	8	3	37.5	2	0
OPA20	13	9	69.2	2	2	OPD17	7	4	57.1	4	0
OPB1	11	5	45.5	4	0	OPD19	10	6	60.0	5	0
OPB2	14	9	64.3	4	3	OPD20	11	5	45.5	4	0
OPB3	5	1	20.0	1	0	OPT2	10	6	60.0	2	3
OPB4	14	4	28.6	0	1	OPT3	9	4	44.4	1	1
OPB5	10	4	40.0	3	1	OPT4	8	2	25.0	1	1
OPB6	10	5	50.0	3	0	OPT5	8	1	12.5	0	0
OPB7	14	8	57.1	7	1	OPT6	16	7	43.8	5	1
OPB8	8	6	75.0	1	1	OPT7	9	2	22.2	1	0
OPB9	11	5	45.5	4	1	OPT8	13	2	15.4	0	0
OPB10	10	6	60.0	3	2	OPT9	10	4	40.0	4	0
OPB11	11	7	63.6	4	2	OPT10	11	6	54.5	2	3
OPB12	16	11	68.8	5	3	OPT11	14	6	42.9	3	3
OPB13	13	8	61.5	3	0	OPT12	10	4	40.0	1	3
OPB14	11	3	27.3	2	0	OPT14	14	8	57.1	3	3
OPB15	12	5	41.7	3	1	OPT16	11	5	45.5	0	3
OPB16	11	7	63.6	3	2	OPT17	10	4	40.0	2	2
OPB17	9	3	33.3	2	1	OPT18	12	3	25.0	2	0
OPB18	9	3	33.3	1	2	OPT19	8	3	37.5	2	0
OPB19	13	5	38.5	3	1	OPT20	13	3	23.1	1	2
OPB20	11	7	63.6	3	1	OPAY1	4	1	25.0	0	0
OPC1	5	2	40.0	0	1	OPAY2	12	7	58.3	2	0
OPC2	8	4	50.0	2	1	OPAY3	12	7	58.3	2	1
OPC3	8	2	25.0	2	0	OPAY5	14	9	64.3	6	1
OPC4	8	4	50.0	2	0	OPAY6	14	6	42.9	2	1
OPC6	12	5	41.7	3	0	OPAY7	13	9	69.2	7	2
OPC7	9	6	66.7	3	1	OPAY9	11	4	36.4	2	2
OPC8	10	3	30.0	3	0	OPAY10	16	7	43.8	2	5
OPC10	7	4	57.1	2	0	OPAY11	11	6	54.5	4	1
OPC11	6	4	66.7	3	1	OPAY12	15	7	46.7	1	3
OPC12	6	3	50.0	2	1	OPAY13	12	8	66.7	3	4
OPC13	12	6	50.0	5	0	OPAY14	10	5	50.0	1	1
OPC15	6	2	33.3	1	0	OPAY17	9	3	33.3	1	2
OPC16	6	4	66.7	2	0	Total	942	451		229(70%)	99(30%)
OPC17	9	7	77.8	5	1	Average	10.0	4.8	48.0	2.4	1.1

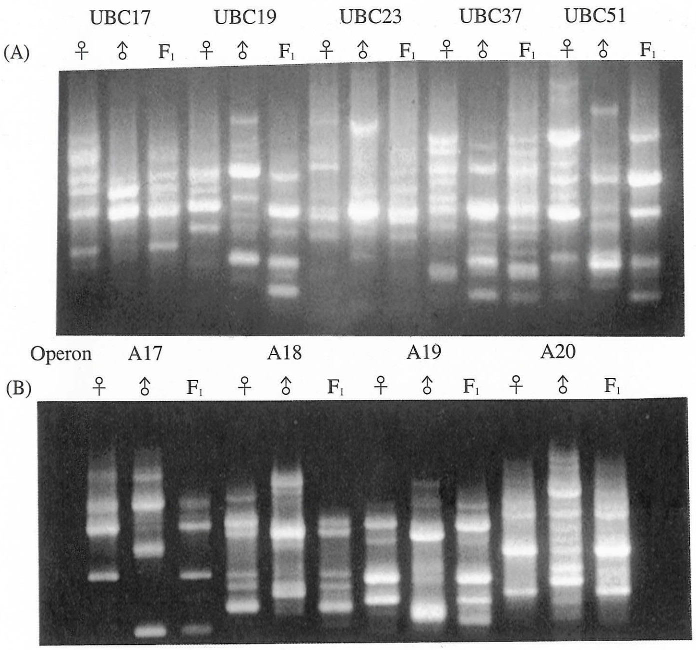

圖1. 在親本及雜交後代具多型性的RAPD引子。

Fig 1. Primers detecting RAPD DNA markers．

(A) UBC 17: CCTGGGCCTC
UBC 19: GCCCGGTTTA
UBC 23: CCCGCCTTCC
UBC 37: CCGGGGTTTT
UBC 51: CTACCCGTGC

(B) Operon A 17: GACCGCTTGT
Operon A 18: AGGTGACCGT
Operon A 19: CAAACGTCGG
Operon A 20: GTTGCGATCC

母本有42個條帶（佔56%），另有33個條帶（平均爲44%）起源野生種父本（表1）。另在Operon系列，多型性條帶平均爲4.8條，多型性比率爲48.0%，兩者均比UBC系列高（表2）；而F_1植株多型性條帶來自母本有229個條帶（佔70%），另有99個條帶（平均爲30%）來自父本，所以RAPD兩系列所測定F_1植株多型性條帶，均偏離預期之50%來自父本或母本，其平均有271個條帶（平均爲67%）來自母本，另有132個條帶（平均爲33%）起源野生種父本。

而像圖1中由UBC19引子所增幅的F_1 DNA最下方有一並非來自父母本的明顯條帶，這種F_1植株具有本身獨特的多型性條帶，在本試驗中偶而可見到（資料未顯示），此可能原因有二，一是在進行PCR熱循環增殖DNA時，原先給予的DNA模版 (temple) 互相競爭引子所造成的試驗誤差；二可能爲動態 (dynamic) 遺傳變異所造成的，係相對於靜態的遺傳變異（指雜交後代個體之變異範圍，僅限於原親本之所有可能基因型之組合），而此種新變異的主要來源可能爲基因間相互作用所產生，或點的突變、不均等交換 (unequal crossing over)、甲基化 (methylation)、基因增幅 (gene amplification)、基因內重組 (intragenic recombination) 等原因所造成。而在本試驗所形成之原因，抑或兩者都有可能，此有待進一步詳細探討。

表3爲綜合整理兩組RAPD的結果，整個有效RAPD引子產生DNA條帶數介於5~16條之間，平均產生的DNA條帶爲10.4條，其中單一引子在親本之間顯現出多型性的條帶介於1~11條之間，平均爲4.3條，多型性比率介於11-80%之間，平均爲41.3%，可見RAPD依使用引子種類之不同，即核苷酸序列不同，所產生DNA條帶、多型性條帶數及多型性比率有很大差異，而若能篩選到DNA條帶數適

表3. RAPD引子在落花生種間雜交兩親本之間產生的DNA條帶數、多型性條帶數及多型性比率程度及分佈範圍

Table 3. Number of bands, polymorphic bands amplified by RAPD primers and their polymorphic rate between the interspecific parents of peanut

No. of bands	No. of primers	Polymorphic bands	No. of primers	Polymorphic rate (%)	No.of primers
16	3	11	1	71-80	4
15	2	9	5	61-70	16
14	11	8	4	51-60	18
13	8	7	13	41-50	37
12	11	6	13	31-40	19
11	17	5	14	21-10	15
10	14	4	32	11-20	9
9	19	3	18		
8	15	2	13		
7	8	1	4		
6	7				
5	1				
Mean=10.4		Mean=4.3		Mean =41.3	

中（約4~6條），但多型性條帶數較多，即多型性比率高的引子如圖1之Operon A 17-19，將能更有效的鑑定作物之雜交種或一般種原。

另利用SSR（Inter-及Intra-）分子標識的測定結果列於表4-6及圖2，表4中Intra-SSR所能測到的

表4. Intra-SSR引子在落花生種間雜交兩親本之間產生的DNA條帶數、多型性條帶數及多型性比率程度及分佈範圍

Table 4. Number of bands, polymorphic bands amplified by Intra-SSR primers and their polymorphic rate between interspecific parents of peanut

No. of bands	No. of primers	Polymorphic bands	No. of primers	Polymorphic rate (%)	No.of primers
		Rice			
15	2	8	1	71-80	1
14	3	7	1	51-60	2
13	3	6	7	41-50	13
12	6	5	8	31-40	8
11	6	4	7	21-30	4
10	4	3	2	11-20	2
9	4	2	3		
8	1	1	1		
6	1				
Mean =11.3		Mean=4.6		Mean =40.7	
		Corn			
16	1	11	1	71-80	2
15	1	10	1	61-70	5
14	1	8	2	51-60	4
13	3	7	3	41-50	4
12	1	6	5	31-40	2
11	3	5	2	21-20	4
10	3	4	1		
9	4	3	2		
8	2	2	3		
7	2				
Mean =10.7		Mean =5.4		Mean =50.5	
Pooled mean=11.1		Pooled mean=5.0		Pooled mean=45.4	

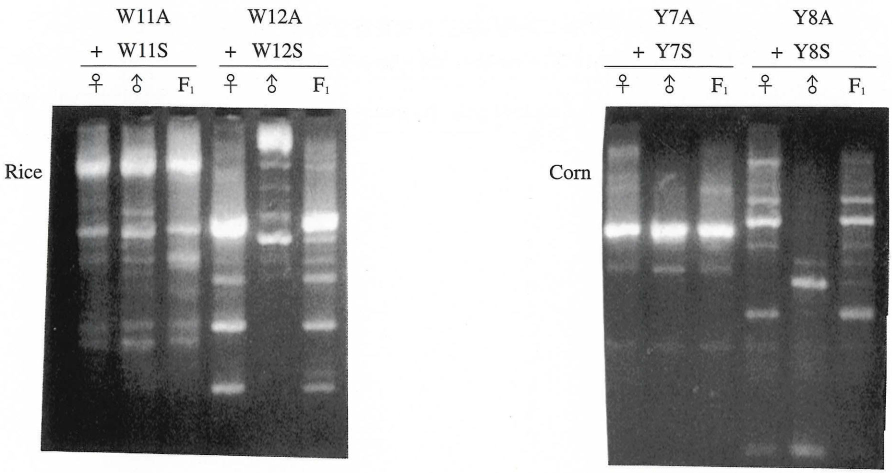

圖2. 在親本及雜交後代具多型性的Intra-SSR引子。

Fig 2. Pimers dectecting polymorphic Intra-SSR DNA markers ·

W11A + W11S: AAGCCTTTCCTGGTAACACG + AACTCATTTGTCACACGCACA

W12A + W12S: ACGAGATACGTACGCCTTTG + AACGCGAGGACACGTACTTAC

Y 7A + Y 7S: ATTTCCAGTTGCCACCGACGAAGAACTT + TTGTCTTTCTTCCTCCACAAGCAGCGAA

Y 8A + Y 8S: GCGGCATCCCGTACAGCTTCAGA + TTACTCCCTATCCACTGCGGCCTGGAC

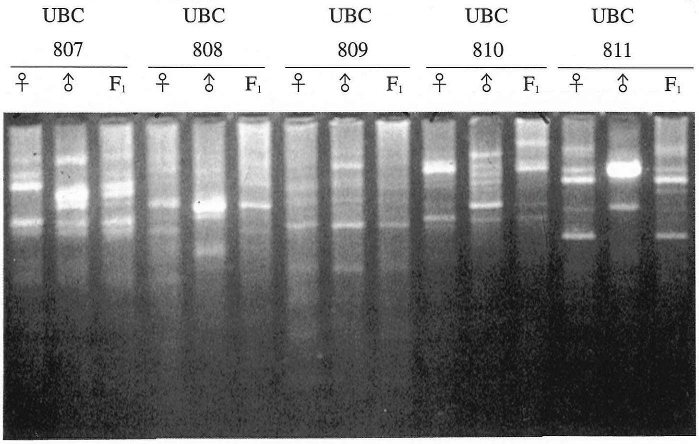

圖3. 在親本及雜交後代具多型性的Inter-SSR引子。

Fig 3. Pimers dectecting the Inter-SSR DNA markers.

UBC 807: AGAGAGAGAGAGAGAGT

UBC 808: AGAGAGAGAGAGAGAGC

UBC 809: AGAGAGAGAGAGAGAGG

UBC 810: GAGAGAGAGAGAGAGAT

UBC 811: GAGAGAGAGAGAGAGAC

表5. 在落花生親本及種間雜交F_1具有多型性之Intra-SSR引子

Table 5. Primers detecting Intra-SSR DNA markers from parents and the interspecific hybrids (F_1) of peanut

Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F_1 polymorphic origin	
				Female	Male
		Rice			
W1A+W1S	9	2	22.2	1	1
W3A+W3S	10	3	30.0	2	0
W5A+W5S	9	4	44.4	2	2
W7A+W7S	6	1	16.7	1	0
W8A+W8S	13	5	38.5	2	2
W9A+W9S	15	4	26.7	2	2
W10A+W10S	8	2	25.0	1	0
W11A+W11S	11	4	36.4	2	2
W12A+W12S	11	8	72.7	3	4
W13A+W13S	14	6	42.9	3	3
3R+3F	11	2	18.2	2	0
13R+13F	12	6	50.0	4	0
22R+22F	12	6	50.0	5	1
24R+24F	12	4	33.3	4	0
26R+26F	11	4	36.4	2	1
27R+27F	12	6	50.0	4	2
30R+30F	12	5	41.7	3	0
34R+34F	12	5	41.7	2	0
38R+38F	9	5	55.6	3	1
41R+41F	15	7	47.7	1	2
44R+44F	9	4	44.5	3	1
51R+51F	10	3	30.0	1	0
53R+53F	14	6	42.9	2	2
55R+55F	14	6	42.9	4	1
60R+60F	10	5	50.0	3	1
80R+80F	13	5	38.5	5	0
83R+83F	10	4	40.0	2	1
202R+ 202F	11	6	54.5	4	0
204R+ 204F	13	5	38.5	3	1
205R+ 205F	11	5	45.5	2	1
Average	11.3	4.6	40.7		
		Corn			
Y1A+Y1S	8	3	37.5	0	2
Y2A+Y2S	11	8	72.7	3	4
Y5A+ Y5S	9	6	66.7	3	2
Y6A+Y6S	15	10	66.7	6	3
Y8A+Y8S	12	7	58.3	3	3
Y9A+Y9S	10	3	30.0	2	0
Y10A+ Y10S	7	3	42.9	1	0
Y12A+Y12S	9	2	22.2	0	1
Y13A+Y13S	9	7	77.8	3	0
Y14A+Y14S	10	4	40.0	2	1
Y15A+Y15S	9	6	66.7	4	1
Y16A+ Y16S	7	2	28.6	1	0
Y17A+Y17S	8	2	25.0	1	0
Y18A+Y18S	13	7	53.8	5	0
Y19A+Y19S	11	5	45.5	2	2
Y20A+ Y20S	11	6	54.5	3	2
Y22A+Y22S	13	8	61.5	3	0
Y23A+Y23S	13	6	46.2	4	0
Y25A+Y25S	14	5	35.7	2	2
Y26A+Y26S	16	11	68.8	4	4
Y27A+Y27S	10	6	60.0	5	0
Average	11.1	5.0	50.5		
Total	564	255		135(70%)	58(30%)
Pooled average	11.1	5	45.4	2.6	1.1

表6. 在落花生親本及種間雜交F_1具有多型性之Inter-SSR引子

Table 6. Primers detecting Inter-SSR DNA markers from the parents and interspecific hybrids (F_1) of peanut

Primer code	No. of bands	Polymorphic bands	Polymorphic rate (%)	F_1 polymorphic origin	
				Female	Male
UBC801	7	4	57.1	2	2
UBC802	5	3	60.0	2	0
UBC804	6	2	33.3	1	0
UBC805	5	3	60.0	2	1
UBC807	7	3	42.9	1	2
UBC808	7	5	71.4	2	1
UBC810	7	4	57.1	2	0
UBC811	5	2	40.0	2	0
UBC812	8	4	50.0	4	0
UBC814	8	5	62.5	3	2
UBC815	6	4	66.7	2	1
UBC817	8	2	25.0	1	1
UBC820	5	3	60.0	0	0
UBC822	7	4	57.1	4	0
UBC827	9	4	44.4	2	2
UBC828	5	2	40.0	1	0
UBC830	7	3	42.9	2	1
UBC834	6	2	33.3	0	2
UBC836	7	4	57.1	3	1
UBC841	6	3	50.0	2	1
UBC843	5	3	60.0	2	1
UBC844	4	2	50.0	2	0
UBC845	7	3	42.9	2	0
UBC846	11	4	36.4	2	1
UBC850	9	3	33.3	2	1
UBC852	5	2	40.0	1	0
UBC855	7	4	57.1	2	0
UBC859	8	4	50.0	2	1
UBC864	8	2	25.0	1	1
UBC873	8	3	37.5	2	1
UBC880	8	3	37.5	1	1
UBC881	9	3	33.3	2	0
UBC884	8	4	50.0	2	2
UBC886	7	3	42.9	1	0
UBC887	10	4	40.0	2	0
UBC888	6	2	33.3	2	0
UBC889	9	4	44.4	1	2
UBC891	11	4	36.4	3	1
Total	271	123		70(71%)	29(29%)
Pooled average	7.1	3.2	45.1	1.8	0.76

條帶數介於6~16條之間，平均爲11.1條，其中來自水稻簡單重複序列引子的爲11.3條，玉米的爲10.7條；而親本之間多型性條帶，則以玉米的5.4高於水稻的4.6，兩者平均爲5.0條，親本之間多型性條帶比率，同樣以玉米的50.5%高於水稻的40.7%，平均則爲45.4%。表5則爲67組Intra-SSR其中能顯現多型性的51組引子個別資料，而Intra-SSR引子在測定F_1的多型性條帶起源，與RAPD引子同樣來自栽培種母本較多，有高達70%（135個）條帶，另有30%（58個）條帶來自野生種父本。在表6中100支Inter-SSR有38支具有親本間之多型性，所能測到的條帶數介於4~11條之間，平均爲7.1條，而親本之間多型性條帶爲3.2條，其在親本之間多型性條帶比率平均爲45.1%，與Intra-SSR多型性條帶比率相近。在測定F_1的多型性條帶起源，同樣有高達71%（70條）條帶是來自母本，只有29%（29條）條帶來自父本。

綜合RAPD及SSR兩項分子標識測定落花生親本的結果（表1-6），以Intra-SSR引子所能顯現的條帶最多，平均爲11.1條，Inter-SSR的平均條帶最低，平均爲7.1條，而RAPD系列平均爲10.4條，所以在條帶數的測定而言，RAPD引子是高於SSR引子，但在測定親本之間多型性條帶的比率，則以SSR的45.3%（Inter-SSR之45.1%及Intra-SSR之45.4%）高於RAPD的41.3%，故可說SSR分子標識的多型性測定落花生種間雜交後代效率是高於RAPD的。

另外，由所有參試的RAPD及SSR引子來比較可在兩親本間偵測出多型性的有效引子百分比（表7），平均57.1%的SSR引子數可偵測出親本之多型性，略高於RAPD之有效引子百分率（53.6%）。就個別在F_1植株上所能測到的多型性條帶而言，同樣以SSR條帶具有多型性百分比35.1%（Intra-SSR及Inter-SSR的34.2%及36.0%）高於RAPD的33.6%，所以針對落花生種間雜種鑑別利用而言，SSR分子標識比RAPD分子標識有較高的多型性測定效率（表7）。無論RAPD或SSR分析均顯示親本間多型性之條帶，來自栽培種與來自野生種之比例約爲2：1。

表7. RAPD及SSR引子測定落花生親本及種間雜交F_1之多型性效率

Table 7. Summary of primers tested in RAPD and SSR studies for the identification of DNA polymorphism in the parents and interspecific hybrid F_1

Type of primer	No. of primers tested	No. of informative primers	% of informative primers	No. of bands	No. of polymorphic bands	% of polymorphic bands
RAPD primer	220	118	53.6	1198	403	33.6
SSR primer	167	89		835	292	
Intra-SSR	67	51	76.1	564	193	34.2
Inter-SSR	100	38	38.0	271	99	36.0
Average			57.1			35.1
Total	387	207		2046	694	

雖然在先前研究發現四倍體栽培種與二倍體野生種落花生雜交所產生後代雜交種，其重要農藝性狀之外表型傾向於中間型或野生種[3]，然而本試驗結果發現，四倍體栽培種所提供之DNA多型性約爲二倍體野生種之兩倍，即使如此，三倍體之種間雜交種外表型仍以二倍體野生種爲主，故本試驗支持作物基因組大小與外表型變異之不一致性現象的存在。

討　論

物種基因組中具有短的核苷酸（1~6個）重複性序列 (short tandem repeat)，能表現出明顯的多型性，可作爲種原之鑑定，稱爲簡單重複序列，簡稱SSR。SSR分子標識可分爲Intra-SSR及Inter-SSR

兩種，Intra-SSR主要利用簡單重覆序列兩旁之保留性序列 (conserved sequence) 設計兩條引子，以放大SSR片段，其多型性來自重複序列數目之不同，所呈現的爲共顯性 (codominant) 的標識，亦即爲多重等位基因 (multiple alleles)，但是在本試驗因使用水稻及玉米之引子，其在落花生種間F_1產生之DNA條帶遠大於共顯性之2條（水稻平均爲11.3條，玉米平均爲10.7條），可知水稻及玉米SSR兩旁之單一片段保留性序列，在落花生卻有多個copy片段存在，由此推知落花生的基因組是較水稻430Mb及玉米爲大。而Intra-SSR的缺點爲設計引子時需有序列的相關資料 (sequence information)，且必需使用較昂貴的MetaPhore gel或定序用的膠 (sequencing gel)。另外利用物種之SSR序列所設計的引子，以放大兩個SSR間之片段，稱爲Inter-SSR，其多型性來自引子是否能與試驗材料的DNA黏接 (annealing)上，此種SSR不需相關的序列訊息，亦可使用一般的agarose gel，分析上較爲簡單且費用低，惟其只是顯性 (dominant) 的標識，而非共顯性，但卻可在不同的物種間使用。而在本試驗中Intra-SSR能夠顯現多型性的引子比率爲76.1%，明顯的高於Inter-SSR的38.0%（表7），可能是因爲Intra-SSR使用成對（2條）引子，較Inter-SSR僅用單一條引子，增值染色體組上DNA片段之專一性較高，故就本試驗結果而言，Intra-SSR比Inter-SSR的有效引子百分比爲高。

由前述可知SSR較RAPD在落花生種間雜交的親本及F_1均有較高的多型性測定效率的試驗結果（表1-7）來看，在本試驗中SSR是比RAPD的測定效果爲佳，且一般而言，SSR的穩定性（條帶的再現性）較RAPD爲好，原因爲SSR的引子序列較RAPD的10氮基對 (bp) 爲長，約爲15~30氮基對，（一般爲20左右），所以引子在黏接上模版DNA的條件較嚴苛，且黏接的溫度較高，時間較短（SSR約爲47-55 ℃，20-30秒; RAPD約爲37-50 ℃，2~3分鐘），所以產生錯誤的機會較小，故DNA條帶再現性高。總結本試驗結果而言，RAPD及SSR兩種分子標識在操作過程簡便，省時，有效率，且不使用放射線或銀染，可測定落花生不同種間的多型性及進行雜交種的鑑定，能有效的應用於本試驗主要目標落花生抗病育種上，及探討雜交後代中野生種種質滲入栽培種的程度，並可進一步廣泛的應用於其他作物的雜交育種上。

由先前的落花生種間雜交後代的鑑定試驗[3]得知，F_1植株之外表型態，除花之旗瓣呈桔黃色與栽培種母本相同外（野生種爲黃色），其餘大部分之外表型態均呈現中間型，包括半匍匐性的植株生長型態，花器的大小，葉片的大小、型態、色澤，及果莢、籽粒的大小等。另外植株生長習性是呈現與父本相同的多年生習性，而在F_1植株上可得到的少數果莢，亦均與父本相同爲單粒莢型態，且果莢網紋明顯，莢啄突出，可知植株外表型態多呈現父母本之中間型，或偏向父本，少數性狀才與母本相近的結果，但本試驗中不論是RAPD或SSR的分析，可發現在落花生種間雜交的F_1的植株，其DNA多型性條帶高達66.8%來自栽培種母本（RAPD爲67%，Intra-SSR爲70%，Inter-SSR爲71%表1-2，5-6），來自父本的僅有33.2%，探究其主要原因可能是四倍體的栽培種母本 (AABB) 與二倍體的父本 (AA)，雜交所得之三倍體F_1 (AAB) 植株，其中2個單倍體A、B基因組 (genome) 均來自母本，僅一個A基因組來自父本所致，所以F_1植株的DNA組成理論上有三分之二來自母本，三分之一來自父本，而以PCR爲基礎的SSR或RAPD分子標誌有較高增幅母本染色體的機會，使得在F_1植株測得多數的DNA條帶來自雌親，而非各50%的雌、雄親量，此種結果與細胞遺傳之染色體數分析結果相符[3]，說明並無染色體流失現象發生。而在F_1植株呈現外表型偏向父本或中間型，其原因可能是控制這些主要性狀的基因大都位在A基因組上，且在野生種中多爲顯性性狀，或是四倍體栽培種在多倍體化或在馴化選拔過程中，不具作用或隱性對偶基因的頻度增高所致，仍有待進一步研究。而不同倍數性之親本對後代DNA多型性來源之貢獻不同，像具異元多倍體 (AABB) 之栽培種，有利於種間雜交種之DNA多型性，進而提供較多有用的DNA標識，供基因定位或分子育種上之利用。

引用文獻

1. 張同吳。1995。台灣落花生品種（系）之遺傳研究。中興大學農藝學研究所碩士論文。
2. 黃惠娟、曹文隆、楊金興、蔡志濃。1996。引進落花生種原之特性評估。中華農業研究 45: 15-25。
3. 黃惠娟、曹文隆、林順福、謝兆樞、蔡志濃。1999。落花生種間雜交種之鑑別及其特性分析。中華農業研究 48: 40-51。
4. Bromfield, K.R., and W.K. Bailey. 1972. Inheritance of resistance to *Puccinia arachidis* in peanut. Phytopathology 62: 748.
5. Burow, M.D., C. E. Simpson, A.H. Paterson, and L. J. Starr. 1996. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Melioidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. Mol. Breed. 2: 369-379
6. Coffelt, T.A. 1974. Inheritance of growth habit in an intraspecific-cross population of peanut. J. Hered. 65: 160-162
7. Doyle, J.D., J.L. Doyle, and L.H. Bailey. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
8. Garcia, G.M., H.T. Stalker, and G. Kochert. 1995. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. Genome 38: 166-176.
9. Halward, T.M., H.T. Stalker, E.A. Larve, and G. Kochert. 1991. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resource of cultivated peanut and related wild species. Genome. 34: 1013-1020.
10. Halward, T.M., H.T. Stalker, and G. Kochert. 1993. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. Theor. Appl. Genet. 87:379-384.
11. Hammons, R. O. 1973. Genetics of *Arachis hypogaea*. Pp.135-174. *In* Peanut: culture and uses. Am. Peanut Res. Edu. Asso. OK. USA.
12. He, G., and G. S. Prakash. 1997. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, L). Euphtica 97: 143-149.
13. Reddy, L.J., A.G.S. Subrahmanyam, D. McDonald, and R.W. Gibbons. 1992. Registration of icgv 87157, an elite peanut germplasm with multiple resistance to diseases. Crop Sci. 32:837.
14. Simposon, C. E., S. C. Nelson, J. L. Starr, K. E. Woodard, and O. D. Smith. 1993. Registration of TXAG-6 and TXAG-7 peanut germplasm lines. Crop Sci. 33: 1418.
15. Singh, A.K., and J.P. Moss. 1984. Utilization of wild relatives in the genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. Fertility in triploids: cytological basis and breeding implication. Peanut Sci. 11: 17-21.

Identification of the Inconsistence between Genomic Constitution and Phenotypic Variation in Interspecific Hybrids ($4x \times 2x$) of Peanut with DNA Marker [1]

Huey-Jiuan Huang[2], Shun-Fu Lin[3] and Jaw-Shu Hsieh[4]

Summary

In this study RAPD and SSR markers were used to analyze genomic context of interspecific hybrids (*A. hypogaea* L. × *A. spegazzinii* L.) of peanut. Frequencies and parental origins of DNA polymorphic bands were investigated for the interspecific hybrids ($4x \times 2x$). The results indicated that about 11 bands were PCR amplified from total genomic DNA of peanuts with intra-SSR primers of rice or corn, and about 7 bands were amplified with inter-SSR primers. The averaged polymorphic rates were 45.4% and 45.1% for a pair of intra-SSR primer and an inter-SSR primer, respectively. However, the averaged polymorphic rate for a RAPD primer was 41.3%. The percentages of a (pair of) primer with polymorphic bands between interspecific parents were 34.2, 36.0% and 33.6% for intra-SSR (rice/corn), inter-SSR, and RAPD primers, separately. About twice (66.8%) polymorphic bands were contributed from allotetraploid parent compared to diploid parent (33.2%) providing molecular evidence of genomic context of interspecific hybrids and inconsistence between genomic contribution and phenotypic variation. This information is valuable for genome and gene expression studies as well as the utilization of interspecific hybridization in plant breeding.

Key words : Peanut (*Arachis hypogaea*), Interspecific hybrids, Molecular marker.

---

1. Contribution No.2075 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.

2. Assistant Agronomist , Department of Agronomy, TARI., Wufeng, Taichung, Taiwan.

3. Former Assistant Agronomist, Department of Agronomy, TARI and currently Assistant Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University (NTU), Taipei, Taiwan.

4. Professor, Department of Agronomy, NTU, Taipei, Taiwan.